

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN CHẾ PHẨM VI SINH CẢI TẠO ĐẤT NÔNG NGHIỆP ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Thị Ngọc Trúc¹, Lê Thị Thu Hồng¹,
Cao Ngọc Diệp² và Nguyễn Minh Châu¹

SUMMARY

Research and development microorganism product for improving agricultural soil in Mekong Delta

Mekong Delta agricultural soil is considered as the rich soil for plant's growth. However, due to the good condition of weather also causes the fast growth of pest. Therefore, the farmer here have been used a lot of agro- chemical products. More over, the longtime used of inorganic fertilizer (15 to 20 years) will create the cadmium content in soil, which cause cancer for human being (A C Gaur, 2006). And the using too much pesticide have created the biotype of insect, fungus and bacteria...

Microorganism is the small organisms which can multiply very fast and can degrade everythings. There fore, using of useful soil organisms in rhizosphere is the best choise to improve the agricultural soil in Mekong Delta. Useful microorganisms play very important role in making the suistanable agriculture. In this research, the fixing bacteria, phosphate solubilizing bacteria and phytohormon releasing bacteria have been isolated, identified, searched for suitable carriers, and tested in vegetable crop in Mekong Delta.

Key words: Useful microorganism, fixing bacteria, phosphate solubilizing bacteria, phytohormon releasing bacteria, agricultural soil.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ¹

Đất nông nghiệp Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) được xem là màu mỡ, phì nhiêu, được thiên nhiên ưu đãi. Tuy vậy, mặt trái của điều này là dịch hại sâu bệnh quá nhiều và từ đó, người dân nơi đây đã sử dụng một lượng lớn thuốc bảo vệ thực vật cũng như quá nhiều các sản phẩm nông hóa khác nhau. Việc sử dụng phân bón vô cơ theo thời gian dài từ 15 đến 20 năm sẽ làm tồn dư một lượng kim loại nặng (Cadmium...) trong đất đủ làm nguy hiểm đến sức khỏe con người (A C Gaur, 2006). Hậu quả của việc sử dụng quá nhiều thuốc bảo vệ thực vật là tạo ra những dòng sâu hại, vi khuẩn... kháng thuốc. Ngoài ra, đất bị chai lì, cằn cỗi là một hậu quả tất yếu.

Vi sinh vật là những sinh vật có cấu tạo đơn giản nhưng lại có khả năng phân chia, sinh sản rất nhanh với hệ enzyme phong phú có khả năng phân hủy hầu như mọi dạng vật chất trong tự nhiên. Do đó, việc tìm ra những loài vi sinh vật có ích sống trong vùng rễ mang ý nghĩa thiết thực

cho nông nghiệp hiện đại; Việc sử dụng những loài vi sinh vật này giúp nâng cao năng suất cây trồng một cách an toàn, bền vững và thân thiện môi trường. Vi sinh vật hoạt động như những nhà máy sinh học, chúng có thể phân hủy kim loại nặng tồn đọng và cũng có thể phân giải những phân tử lân bị cố định trong đất, hay cố định đạm từ khí trời và giải phóng những Phytohormon kích thích sự sinh trưởng của cây trồng...Chúng tôi tiến hành phân lập những dòng vi sinh vật hữu ích đa dạng và nghiên cứu môi trường nhân nhanh sinh khối thích hợp để tạo chế phẩm vi sinh có ích góp phần cải tạo đất nông nghiệp Đồng bằng sông Cửu Long.

II. VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập và định danh các dòng vi khuẩn có ích vùng rễ:

Đất vùng rễ thu từ các ruộng rau trồng ở tỉnh Tiền Giang, miền Nam, Việt Nam.

Môi trường phân lập vi khuẩn: King's, Pikovskaya và môi trường Congo Red (Kaushik, 2004).

Phương tiện để ly trích AND vi khuẩn và giải mã trình tự nucleotide của ADN của các dòng

¹ Viện Nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam.

² Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.

PGPR thu được: Instagene™ MaxTrix, TE 1X, Máy ly tâm Minispin - Eppendorf, Bếp đun cách thủy, Máy vortex, Máy ủ nhiệt, Tủ Bio Clean Beach.

Phương pháp phân lập và định danh các dòng vi khuẩn có ích vùng rễ:

Đo khả năng hòa tan lân theo Kaushik, 2004, cố định đạm (Cao Ngọc Diệp, 2005) và giải phóng IAA theo (Cao Ngọc Diệp, 2005).

Phương pháp trích ADN:

(1) Lấy huyền dịch vi khuẩn cho vào tube Eppendorf 1.5 ml đã có sẵn 200 µl dung dịch instagene (vortex instagene thật kỹ trước khi sử dụng), vortex 10 giây và sau đó spin nhẹ.

(2) Ủ mẫu ở 56°C trong 30 phút trong máy cách thủy hay trên máy ủ nhiệt khô.

(3) Vortex mẫu trong 10 giây và đem đun sôi mẫu 100°C trong 8 phút, lấy ra cho liền vào trong nước đá trong 5 phút. Rồi đem ly tâm 13.200 rpm trong 5 phút.

(4) Hút dịch nổi sang tube Eppendorf mới. Sau đó tiến hành pha loãng 10 lần dịch nổi thu được. Dùng 5 µl dịch nổi này cho một tube thử nghiệm PCR.

Quá trình PCR và giải trình tự acid nucleotide:

Tên thuốc thử	Thành phần
^{NK} 16S - PCR Mix	Môi, MgCl ₂ , Tris HCl, KCl, taq polymerase, dNTP, UNG, dUTP

Môi xuôi: 5' - AGA GTT TGA TCA TGG CTC A - 3'

Môi ngược: 5' - AAG GAG GTG ATC CAG CC - 3'

(1) Lấy 5µl DNA của vi khuẩn sau khi ly trích cho vào PCR mix.

(2) Cho tube PCR vào buồng luân nhiệt của máy PCR, chạy chương trình luân nhiệt như sau:

- 1 chu kỳ 95⁰C trong 10 phút
- 40 chu kỳ 94⁰C trong 30 giây
- 60⁰C trong 30 giây
- 72⁰C trong 1 phút
- 3 chu kỳ 72⁰C trong 10 phút

(3) Phân tích kết quả: Phát hiện sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di nhúm chìm trên

gel agarose 2% hoặc điện di trên DNA chip trên hệ thống Bio Analyzer. Sản phẩm PCR có độ dài khoảng 500 bp.

(4) Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và tiến hành giải trình tự trên hệ thống ABI 3130XL.

(5) Kết quả 16S PCR được điện di trên gel agarose 2%.

2. Nghiên cứu môi trường nhân nhanh sinh khối thích hợp

Hai dòng vi khuẩn vùng rễ *Burkholderia tropica* và *Enterobacter cloacae* được phân lập từ môi trường Pikovskaya và King's B (Kaushik, 2004; Cao Ngọc Diệp, 2005). Hai dòng được định danh đến cấp độ loài bằng phương pháp giải trình tự ADN của vi khuẩn, so sánh trên ngân hàng gen thế giới. Vi khuẩn được trữ trong Glycerol 20% trữ trong tủ nhiệt độ âm 20⁰C. Sau đó, hỗn hợp vi khuẩn này được cấy vào môi trường nhân sinh khối (dung dịch sucarose với các nồng độ khác nhau từ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, đến 4.5 g/l) và được đo sinh khối cũng như pH tại các thời điểm 5, 10, 15 và 25 ngày sau khi chủng vi khuẩn.

Dụng cụ: Đường sucarose, máy đo pH, cân trọng lượng, xô mũ, thước, viết, máy chụp ảnh...

Phương pháp đo sinh khối vi khuẩn: Sinh khối của vi khuẩn được đo bằng cách cân trọng lượng của dung dịch nuôi vi khuẩn trước và sau khi chủng vào dung dịch ở các khoảng thời gian khác nhau.

Phương pháp khảo sát khả năng sản sinh acid hữu cơ của vi khuẩn: Thông qua việc đo pH của môi trường nhân nhanh vi khuẩn. Khi pH giảm có nghĩa là vi khuẩn đang sản sinh ra acid hữu cơ làm giảm pH của môi trường.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả phân lập và định danh các dòng PGPR

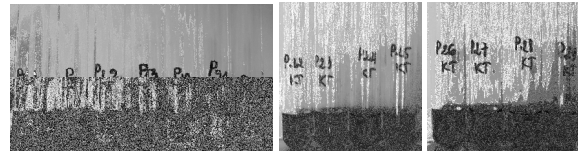
40 dòng vi khuẩn giải phóng IAA được phân lập từ các địa điểm khác nhau từ vùng rễ của đất trồng rau tại tỉnh Tiền Giang, cho thấy đa số các chủng vi khuẩn trên có màu trắng đục, trắng sữa lồi, rời rạc.

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của 40 dòng vi khuẩn giải phóng IAA được phân lập

STT	Dòng vi khuẩn	Đặc điểm			
		Màu sắc	Hình dạng	Độ nổi	Bia
01	P1	Trắng đục	Tròn đều	Lồi	Trơn
02	P2	Trắng đục	Tròn đều	Lồi	Trơn
03	P3	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Mép vô sò
04	P4	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Gợn sóng
05	P5	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Gợn sóng
06	P6	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
07	P7	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
08	P8	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
09	P9	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
10	P10	Trắng đục	Tròn đều	Lồi	Trơn
11	P11	Trắng đục	Không đều, lan rộng	Nổi	Trơn
12	P12	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Gợn sóng
13	P13	Trắng đục	Tròn đều	Lồi	Trơn
14	P14	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
15	P15	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Lồi	Gợn sóng
16	P16	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
17	P17	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
18	P18	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
19	P19	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Gợn sóng
20	P20	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Mép vô sò
21	P21	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Mép vô sò
22	P22	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
23	P23	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
24	P24	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
25	P25	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
26	P26	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
27	P27	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
28	P28	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Gợn sóng
29	P29	Trắng đục	Tròn đều	Lồi	Trơn
30	P30	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Lồi	Mép vô sò
31	P31	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
32	P32	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Lồi	Gợn sóng
33	P33	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
34	P34	Trắng đục	Không đều, lan rộng	Lồi	Gợn sóng
35	P35	Trắng sữa	Tròn đều	Lồi	Trơn
36	P36	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Mép vô sò
37	P37	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Mép vô sò
38	P38	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Gợn sóng
39	P39	Trắng sữa	Không đều, lan rộng	Nổi	Mép vô sò
40	P40	Trắng đục	Không đều, lan rộng	Nổi	Gợn sóng

Khảo sát đặc tính sinh hóa các dòng PGPR

Kết quả khảo sát về đặc tính sinh hóa của các dòng vi khuẩn cố định đạm thu thập được, khi thử với thuốc thử Salkowski các dòng đều phản ứng với thuốc thử và có màu hồng, màu đặc trưng của thuốc thử Salkowski. Màu hồng có độ đậm nhạt khác nhau, đối với các vi khuẩn được nuôi trong môi trường có thêm L - tryptophan thì ở dòng P10 có màu hồng nhạt nhất và dòng P18 có màu hồng đậm nhất (hình 1). Còn đối với các vi khuẩn được nuôi trong môi trường không có L - tryptophan thì ở dòng P22 có màu hồng nhạt nhất và dòng P24 có màu hồng đậm nhất (hình 1).



Hình 1. Phản ứng với thuốc thử Salkowski (Có tryptophan) (Không tryptophan)

Trong 40 dòng PGPR có khả năng giải phóng IAA, dòng P24 là dòng thể hiện ưu điểm nhất vì chúng chuyển màu đậm nhất trong môi trường không có tryptophan, nó sẽ giải phóng IAA cao nhất trong tự nhiên.

Bảng 2. Khả năng tổng hợp IAA của 40 dòng vi khuẩn

Dòng vi khuẩn	IAA µg/ml	Dòng vi khuẩn	IAA µg/ml	Dòng vi khuẩn	IAA µg/ml	Dòng vi khuẩn	IAA µg/ml
P1	8.11	P11	8.03	P21	4.96	P31	11.55
P2	8.40	P12	3.76	P22	5.27	P32	5.61
P3	10.78	P13	4.32	P23	9.16	P33	7.50
P4	2.66	P14	5.08	P24	22.86	P34	8.20
P5	5.57	P15	6.71	P25	6.00	P35	5.58
P6	7.25	P16	5.19	P26	7.74	P36	3.87
P7	9.93	P17	10.61	P27	8.56	P37	6.04
P8	5,05	P18	16.92	P28	3.86	P38	6.18
P9	7.78	P19	6.46	P29	8.68	P39	6.04
P10	3.32	P20	10.57	P30	9.18	P40	7.75
SE (N = 4)				2.84			
LSD _{0,05}				7.97			

Kết quả ở bảng 2 cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp IAA, thống kê cho thấy các trọng lượng IAA của các dòng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa và khoảng biến động về trung bình trọng lượng IAA trong khoảng (2.66 - 22.86 µg/ml), trong đó dòng P4 có trung bình về trọng lượng nhỏ nhất 2.66 µg/ml và dòng P24 có trung bình về trọng lượng cao nhất là 22. 86 µg/ml. Theo kết quả của Patten & Glick, 2002 đã thành công trong nguyên cứu về khả năng sản xuất IAA của *Azospirillum* bằng thuốc thử Salkowki. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu này cũng đã nghiên cứu về khả năng sản xuất IAA của *Pseudomonas*, được nuôi cấy 48 giờ sau đó dùng pipet hút 1 ml và 4 ml thuốc thử Salkowki, sau đó lắc 20 phút ở nhiệt độ (26 ± 1°C) quan sát sự chuyển sang màu hồng và được đo ở máy quang phổ và xác định nồng độ IAA mà vi khuẩn *Pseudomonas* tạo ra. Patten & Glick, 2002 cũng đã dùng thuốc thử Salkowki để kiểm tra và định lượng IAA

tạo ra của các dòng vi khuẩn. Yoshida, S and M.Yatazawa, 2003 đã phân lập được 21 dòng vi khuẩn (*Azotobacter* sp., 10 and *fluorescent Pseudomonas* sp., 11), được phân lập từ các vùng đất khác nhau. Mức độ tổng hợp IAA thấp đối với các dòng không thêm tryptophan. 7 dòng *Azotobacter* cho thấy khả năng tổng hợp IAA cao (7.3 - 32.8 mg/ml). Đối với *fluorescent Pseudomonas* có khả năng tổng hợp IAA cao cả trong môi trường không có tryptophan, 5 dòng tổng hợp IAA cao nhất (41.0 - 53.2 mg/ml) và 6 dòng có lượng IAA được tổng hợp ở mức (23.4 - 36.2 mg/ml).

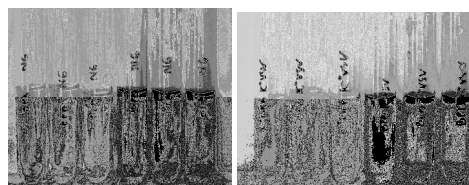
Kết quả nhuộm Gram 2 dòng P18 và P24 cho thấy cả hai dòng này đều là vi khuẩn Gram âm.

Quan sát hình dạng và khả năng di động: Kết quả quan sát dưới kính hiển vi cho thấy dòng P18 và P24 có hình que và có khả năng chuyển động chậm.

Phân lập vi khuẩn cố định đạm

40 dòng vi khuẩn được phân lập từ các địa điểm khác nhau từ vùng rễ của đất trồng rau tại tỉnh Tiền Giang, vi khuẩn trên được phân lập từ môi trường King's B, kết quả cho thấy đa số các chủng vi khuẩn trên có màu trắng đục, trắng sữa lồi, rời rạc.

Khảo sát khả năng cố định đạm bằng thuốc thử BPB



Hình 2. Sự đổi màu môi trường MS₀ với thuốc thử BPB

Bảng 3. Kết quả phân tích khả năng cố định đạm của các dòng vi sinh vật thu được

Dòng vi khuẩn	pH	Dòng vi khuẩn	pH	Dòng vi khuẩn	pH	Dòng vi khuẩn	pH
N1	4.32	N11	4.69	N21	4.89	N31	4.40
N2	4.05	N12	4.35	N22	4.28	N32	4.67
N3	4.38	N13	5.07	N23	4.28	N33	4.55
N4	4.42	N14	4.92	N24	4.37	N34	4.58
N5	4.04	N15	4.73	N25	4.55	N35	4.15
N6	4.31	N16	4.85	N26	4.72	N36	4.25
N7	4.35	N17	4.57	N27	4.05	N37	4.47
N8	4.80	N18	5.77	N28	4.44	N38	4.13
N9	4.34	N19	4.59	N29	4.63	N39	4.28
N10	4.24	N20	4.52	N30	4.68	N40	4.65
<i>SE (N = 3)</i>				<i>0.58</i>			
<i>LSD_{0,05}</i>				<i>1.62</i>			

Kết quả thống kê ở bảng 3 cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm, sự tăng lên về độ pH của các dòng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa và khoảng biến động về trung bình trong độ pH (4.05 - 5.77), trong đó dòng N27 có trung bình về độ pH thấp nhất 4.05 và dòng N13, N14 và N18 cao trong đó dòng **N18** có trung bình về độ pH cao nhất. Điều đó cho thấy là dòng N18 có khả năng tổng hợp được đạm cao so với các dòng còn lại.

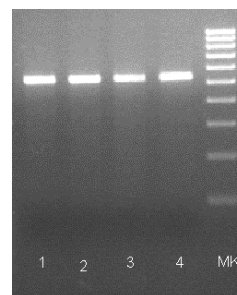
Kết quả phân lập vi khuẩn hòa tan lân:

Kết quả phân tích khả năng hòa tan lân của các dòng vi khuẩn phân lập được cho thấy độ biến động của các dòng vi khuẩn từ 26 đến 621 mg/l P₂O₅. Trong đó dòng thể hiện khả năng hòa tan lân cao hơn cả là N18.

Từ 80 dòng phân lập được từ đất trồng rau tại Tân Hiệp, Châu Thành, Tiền Giang và kết quả đánh giá khả năng cố định đạm, hòa tan lân cho thấy dòng N18, P24, N 31, N33 là bốn dòng ưu việt nhất. Trong đó, dòng N18 vừa có khả năng cố định đạm, vừa có khả năng hòa tan lân cao

nhất, dòng P 24 thì có khả năng giải phóng IAA cao nhất, dòng N 31 và dòng N33 thì có khả năng hòa tan lân khá cao. Từ đó, 4 dòng này được tiến hành định danh ở cấp độ sinh học phân tử, giải trình tự nucleotide của ADN, sau đó sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI, tìm tỷ lệ đồng hình và xác định tên loài của các dòng vi khuẩn phân lập được.

Kết quả chạy PCR xác định các dòng vi khuẩn phân lập được:



Hình 3. Sản phẩm PCR, giếng 1. dòng N 31, giếng 2. dòng N 33, giếng 3. dòng P24, giếng 4. dòng N18.

KẾT QUẢ GIẢI TRÌNH TỰ ADN

Kết quả giải trình tự gen 16S dòng N31

CCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCAC
GAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGAGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTAC
TCTGTCTGGGAGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGA
AAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC GCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGG
CGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
ACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA
ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA
GCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCATCTGGTTAATACCCGGGTGGGATGACGGTACCCAA
AGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAC

Kết quả giải trình tự gen 16S dòng N33

ATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACCATGCAAGTCGAACGGTAGC
ACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTG
CCTGATGGAGGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC
CAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTA
GGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTTACGCGGGGAGGAAGGCGATAAAGTTAATAACCTTGTTCGATTGACGTTACCCG
CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGAGCCCCGGCGGTAACGTCAATCGACGAGG
TTTATAAACCTTTATCCCTTCCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTC
ATACACGCGG

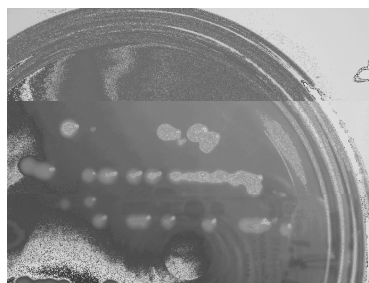
Kết quả giải trình tự gen 16S dòng P24

CTTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGT
CGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGT
CTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAA
CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGG
GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAGTACTTTTACGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACACAGCAAT
TGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGAGCCCCGGGTAACATCTT
TGCTGTGGTTATCAACCACAACCTTCCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACA

Kết quả giải trình tự gen 16S dòng N18

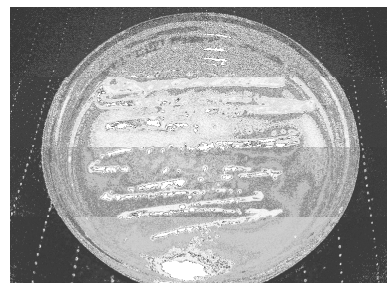
TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTC
GAACGGCAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATC
GGAACGTGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGAT
CTACGGATGAAAGCGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTATAGGGGCGGCCGATGGCGGAT
TAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGA
CGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCCTGGTCCCTAATATGGCCGGGGGATGA
CGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGGTAA

Kết quả so sánh trình tự nucleotide của các dòng vi khuẩn trên trong Genbank cho thấy: Các dòng có tên loài lần lượt là: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cancerogenus*, *Burkholderia tropica* và *Enterobacter cloacae*.



Hình 4. *Enterobacter cloacae*

Để tiếp tục nghiên cứu tạo sinh khối, chúng tôi chọn hai dòng ưu tú nhất là: *Burkholderia tropica* và *Enterobacter cloacae*.



Hình 5. *Burkholderia tropica*

2. Kết quả khảo sát khả năng tạo sinh khối của hỗn hợp vi khuẩn *Burkholderia tropica* và *Enterobacter cloacae* (BT - EC)

Bảng 4. Ảnh hưởng của các nồng độ đường khác nhau đến sinh khối và pH của hỗn hợp vi khuẩn *Burkholderia tropica* và *Enterobacter cloacae* (BT - EC)

Nồng độ đường (g/l)	Sinh khối (g)	pH
0	546.583	8.55
0.5	549.250	7.06
1	536.750	7.48
1.5	538.750	6.83
2	548.000	7.25
2.5	544.167	6.69
3	552.833	6.63
3.5	539.083	6.62
4	549.917	6.61
4.5	545.333	6.62
SE	0.182567 0.513761	0.13
LSD _{0,05}		0.38

Kết quả khảo sát sinh khối của hỗn hợp vi khuẩn BTEC từ các nồng độ đường khác nhau ở bảng 4 cho thấy nồng độ đường 3 g/l là nồng độ tối hảo cho sự phát triển sinh khối của hai dòng vi khuẩn BTEC này. Sau đó, mặc dầu nồng độ đường có cao hơn (3,5 đến 4,5 g/l) nhưng sinh khối bắt đầu giảm xuống. Điều này cho thấy hoàn toàn phù hợp với đường cong sinh trưởng

của vi sinh vật: Chúng chỉ hấp thu đến ngưỡng nhất định, sau đó sẽ đi xuống đầu cho nguồn thức ăn trong môi trường có lên cao bao nhiêu đi nữa.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian sau khi chủng đến sinh khối của hỗn hợp vi khuẩn (BT - EC)

Thời gian sau khi chủng (ngày)	Sinh khối (g)
10	539.500
15	550.900
25	539.000
SE	0.115465
LSD _{0,05}	0.324931

Qua kết quả ở bảng 5 cho thấy ở giai đoạn 15 ngày, sinh khối của hỗn hợp vi sinh vật tăng cao khác biệt có ý nghĩa so với giai đoạn 10 và 25 ngày sau khi chủng. Điều này đã chứng tỏ rằng, ở giai đoạn 15 ngày sau khi chủng là thời gian tối ưu nhất để thu sinh khối của hai dòng BTEC trong môi trường đường sucarose.

Khi khảo sát về ảnh hưởng nồng độ đường đến pH của môi trường nuôi cấy vi sinh vật (bảng 4) cho thấy, ở nghiệm thức đối chứng, không có đường trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn, pH ở mức cao nhất 8.55. Trong khi ở tất cả các nghiệm thức còn lại pH đều giảm một cách có ý nghĩa so với đối chứng. Trong đó, các nghiệm thức nồng độ đường từ 3 g/l đến 4.5 g/l pH khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Điều

này chứng tỏ rằng khi nồng độ đường tăng từ 3 đến 4.5 g/l, vi khuẩn sản sinh acid hữu cơ không khác biệt ý nghĩa cho dù nồng độ đường có tăng cao đi nữa.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian đến độ pH của môi trường nhân sinh khối vi khuẩn

Thời gian (ngày)	pH
0	9.12
5	6.81
10	6.44
15	5.76
SE	0.86
LSD _{0,05}	0.24

Kết quả trên cho thấy, khi chủng vi khuẩn vào môi trường, pH của môi trường đã giảm một cách có ý nghĩa. pH đã giảm từ 0 ngày đến 15 ngày, điều này chứng minh sự sản sinh ra acid hữu cơ của vi khuẩn khi nuôi trong môi trường đã tăng dần và qua đó cũng chứng minh khả năng cải tạo đất của những dòng vi khuẩn này.

Bảng 7. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn khác nhau đến độ pH của môi trường nhân sinh khối

Vi khuẩn	pH
<i>Burkholderia tropica</i>	7.27
<i>Enterobacter cloacae</i>	7.48
BTEC	6.25
SE	0.86
LSD _{0,05}	0.24

Từ kết quả bảng trên cho thấy, khi chủng hai dòng vi khuẩn BT và EC chung, chúng có tác dụng cộng hưởng. Sự giảm pH một cách khác biệt rất có ý nghĩa giữa việc chủng đơn lẻ và chủng hỗn hợp cho ta thấy tác dụng tích cực của việc chủng hỗn hợp nhiều dòng vi khuẩn.

Ngày nay nhiều nghiên cứu đã cho thấy kỹ thuật chủng đa dòng vi sinh vật đang thể hiện sự tương tác kết hợp: Cung cấp dinh dưỡng, loại bỏ chất ức chế, kích hoạt lẫn nhau về các hoạt động sinh lý, sinh hóa... Một trong những ví dụ về điều này là dòng *Azospirillum* kết hợp với vi khuẩn phân hủy đường đơn hay đường đa (sugar - or polysaccharide - degrading bacteria: PDB), bằng cách là sản phẩm của vi khuẩn phân hủy đường

phân hủy và lên men sẽ được *Azospirillum* sử dụng như nguồn Cacbon, sau đó nó sẽ cung cấp lại cho vi khuẩn phân hủy đường dưới dạng N. Một ví dụ khác là sự hợp tác giữa *Azospirillum* và *Bacillus* phân hủy pectin, *Azospirillum* và *Cellulomonas* phân hủy cellulose và *Azospirillum* và *Enterobacter cloacae* lên men đường. Ảnh hưởng tích cực của *Azospirillum* đến cây trồng có thể tăng cao khi cùng chủng với các vi sinh vật khác. Cùng chủng thường làm tăng sự phát triển và năng suất nếu so với chủng đơn, nó cung cấp dinh dưỡng cân bằng hơn và tăng cường sự hấp thu N, P và khoáng chất. Do đó, để tăng cường sự phát triển của cây trồng có thể kết hợp việc chủng *Azospirillum* và vi khuẩn phân giải lân (Alagawadi và Gaur, 1992; Belimov và ctv, 1995). *Azospirillum* cũng được hiểu như là "Rhizobium - Y helper", kích hoạt sự hình thành nốt sần, hoạt động của nốt sần và sự hô hấp của cây trồng, tất cả những hoạt động này nhằm giúp tăng cường tính đề kháng của cây trồng với điều kiện môi trường không thuận lợi (Andreeva và ctv., 1993). Một trong những sự kết hợp tốt bao gồm *Azospirillum* hay *Azotobacter* trộn với *Streptomyces* và *Azospirillum* với tác nhân nấm phòng trừ sinh học, *Phialophora radicola*. Sự trộn lẫn giữa diazotrophic bacteria và nấm arbuscular - gây ra sự tương tác tốt tăng sự phát triển cây trồng, tăng lượng P trong cây, tăng trường khoáng chất như Zn, Cu, Fe... (Al - Nahidh và Gomah, 1991).

IV. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 40 dòng PGPR, trong đó có 2 dòng được chọn sử dụng cho việc sản xuất chế phẩm vi sinh là *Burkholderia tropica* và *Enterobacter cloacae*.

- Về khả năng nhân sinh khối của hai dòng vi khuẩn *Burkholderia tropica* và *Enterobacter cloacae* là: Nồng độ đường sucacrose ở mức 3g/l là nồng độ thích hợp nhất cho hai dòng vi khuẩn BTEC tạo sinh khối và ở thời điểm 10 ngày sau khi chủng là thời điểm thích hợp nhất để thu hoạch sinh khối hỗn hợp vi sinh BTEC này. Bên cạnh đó, việc phối trộn hai dòng vi khuẩn vùng rễ

BT và EC so với để từng dòng riêng rẽ cho hiệu quả tích cực. Kết quả khảo sát khả năng sản sinh acid hữu cơ của dòng vi khuẩn BT là: 7.27 và của EC là 7.48 trong khi của hỗn hợp BTEC là 6.25. Kết quả này một lần nữa góp phần khẳng định hiệu quả của việc phối trộn các vi khuẩn cố định vùng rễ kích thích sinh trưởng thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- A C Gaur. (2006), Biofertilizer in sustainable Agriculture, Indian council of agricultural research, New Dehli.
- Al - Nahidh, S. and Gomah. A.H.M. (1991), Response of wheat to dual inoculation with Vamycorrhiza and Azospirillum, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent, ARID SOIL RES, REHABIL, 5: 83 - 96.
- Andreeva, I.N., Red'kina, T.V. and Ismailov, S.F. (1993), The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of Rhizobium - legume symbiosis by Azospirillum brasilense, Russian J. Plant Physiol, 40: 901 - 906.
- Alagawadi, A.R. and Gaur, A.C. (1992), Inoculation of Azospirillum brasilense and phosphatesolubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land, Trop.Agric, 69: 347 - 350.
- Belimov, A.A., Kojemiakov, A.P. and Chuvarliyeva, C.V. (1995), Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate - solubilizing bacteria, Plant Soil 173: 29 - 37.
- Cao Ngọc Điệp (2005), Giáo trình phân lân sinh học dễ tan, Cần Thơ, NXB. Nông nghiệp.
- Patten Cheryl L, Bernard R Glick (2002), Role of Pseudomonas putida Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System, Applied and Environmental Microbiology, 68: 3795 - 3801.
- Kaushik, B. D., A. K. Saxena, Radha prasanna (2004), Techniques in Microbiology: A Laboratory Manual for Post Graduate Students, Indian agricultural Research Institute, New Delhi.
- Yoshida, S and M.Yatazawa (2003). Species characteristics and cultural conditions as effecting to rhizobial production of IAA, Nippon Dojo Hiriyogaku Zasshi, 44:63.